

B11

JP05184371A

MicroPatent Report

**GENE DNA CODING DIHYDRODIPICOLINIC ACID
SYNTHETASE AND ITS USE**

<p>[71] Applicant: MITSUBISHI PETROCHEM CO LTD</p> <p>[72] Inventors: HATAKEYAMA KAZUHISA; KOBAYASHI MIKI; KURUSU YASUROU; YUGAWA HIDEAKI</p> <p>[21] Application No.: JP04024401</p> <p>[22] Filed: 19920114</p> <p>[43] Published: 19930727</p> <p><u>Go to Fulltext</u></p>	<p>[No drawing]</p>
<p>[57] Abstract: PURPOSE: To provide a new DNA useful for the production of L- lysine. CONSTITUTION: A gene DNA coding a dihydrodipicolinic acid synthetase (E,C,4,2,1, 52) originated from coryneform group bacteria, e.g. a gene DNA coding a dihydrodipicolinic acid synthetase and expressed by the DNA base sequence of formula. It can be produced by cloning a microorganism capable of producing dihydrodipicolinic acid synthetase. COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio</p> <p>[51] Int'l Class: C12N01560 C12N00121 C12N00988 C12N01577 C12P01308 C12N01560 C12R00113 C12N00988 C12R00113 C12P01308 C12R00113</p>	



(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-184371

(43)公開日 平成5年(1993)7月27日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/60	Z N A			
1/21		7236-4B		
9/88		7823-4B		
15/77				
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数 8(全 23 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-24401

(22)出願日 平成4年(1992)1月14日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 島山 和久

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 久留主 泰朗

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ジヒドロジビコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子DNA及びその利用

(57)【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムM J-233

からジヒドロジビコリン酸シンセターゼをコードするDNAを単離し、この遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 このジヒドロジビコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレバクテリウム・フラバムM J-233株は、L-リジンの生成量が増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のジヒドロジピコリン酸シンセターゼ（E. C. 4. 2. 1. 5 2）をコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・フ

ラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ 2 3 3である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

【化1】

```
ATGAGCACAG GTTTAACAGC TAAGACCGGA GTAGAGCACT TCGGCACCGT TGGAGTAGCA 60
ATGGTTACTC CATTACCGGA ATCOGGAGAC ATCGATATCG CTGCTGGCCG CGAAGTCGGC 120
GCTTATTTGG TTGATAAGGG CTGGATTCTT TTGGTTCTCG CGGGCAACCAC TGGTGAATCC 180
CCAACGACAA CCGCCGCTGA AAAACTAGAA CTGCTCAAGG CCGTTCTGTA GGAAGTTGGG 240
GATCGGGCGA AGCTCATCGC CGGTGTCGGA ACCAACAACA CGCGGACATC TGTGGAACCT 300
GCGGAAGCTG CTGCTTCTGC TGGCGCAGAC GGCCTTTTAG TTGTAACCTC TTATTACTCC 360
AAGCCGAGCC AAGAGGGATT GCTGGCGCAC TTGGGTGCAA TTGCTGCAGC AACAGAGGTT 420
CCAATTTGTC TCTATGACAT TCTGGTCCG TCAGGTATTC CAATTGAGTC TGATACCATG 480
AGACGCCCTGA GTGAATTACC TACGATTTTG GCGGTCAAGG ACGCCAAGGG TGAOCTCGTT 540
GCAGCCACGT CATTGATCAA AGAAACGGGA CTTGCTGCTT ATTCAGGCGA TGAOCCACTA 600
AAOCTTGTTT GGCTTGCTTT GGGCGGATCA GGTTCATTT CCGTAATTGG ACATGCAGCC 660
CCACAGCAT TACGTGAGTT GTACACAAGC TTCGAGGAAG GCGAOCCTGT CCGTGGCGCG 720
GAAATCAACG CCAAACTATC AOCGCTGGTA GCTGCCAAG GTGGCTTGGG TGGAGTCAGC 780
TTGGCAAAAG CTGCTTCGCG TCTGCAGGCG ATCAACGTAG GAGATCCTCG ACTTCCAATT 840
ATGGCTOCOA ATGAGCGGGA ACTTGAGGCT CTCCGAGAAG ACATGAAAAA AGCTGGAGTT 900
```

CTATAA

で示されるジヒドロジピコリン酸シンセターゼ（E. C. 4. 2. 1. 5 2）をコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

【化2】で示されるジヒドロジピコリン酸シンセターゼ（E. C. 4. 2. 1. 5 2）をコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項8】 グルコースを、請求項7記載のコリネ型細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-リジンを生成させることを特徴とするL-リジンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

906

【産業上の利用分野】本発明は、ジヒドロジピコリン酸シンセターゼ（E. C. 4. 2. 1. 5 2）をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌由来の遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び該コリネ型細菌を用いるL-リジンの製造法に関する。

【0002】L-リジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物等として用いられている。

【0003】

【従来の技術】従来、L-リジンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてL-リジンを製造する方法等が知られている【例えば、特公昭51-21078号公報、特公昭53-1833号公

報、特公昭62-8692号公報等参照]。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている[特開昭56-160997号公報、特開昭60-62994号公報、特開昭62-79788号公報等参照]。しかしながら、従来提案されている方法によるL-リジンの製造法では、対糖収率が低く及び/又はL-リジンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株の改良等を含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】一方、ジヒドロジピコリン酸シンセターゼ(E.C. 4. 2. 1. 52)をコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)由来の遺伝子[*Journal of Bacteriology*, 105, p 844~p 854, 1971参照]がよく研究されている。また、コリネ型細菌由来のジヒドロジピコリン酸シンセターゼ(E.C. 4. 2. 1. 52)としては、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)が知られている[*Molecular General Genetics*, 212, p 105~p 111, 1988; *Melecular General Genetics*, 220, p 478~480, 1990等参照]。しかしながら、プレビバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*)由来のジヒドロジピコリン酸シンセターゼ(E.C. 4. 2. 1. 52)をコードする遺伝子については従来の報告例は見当たらない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、コリネ型細菌由来のジヒドロジピコリン酸シンセターゼ(E.C. 4. 2. 1. 52)をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-リジンを製造することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌染色体よりジヒドロジピコリン酸シンセターゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-リジンを製造しうることを見出し本発明を完成するに至った。

【0007】かくして、本発明によれば、

- (1) コリネ型細菌由来のジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子DNA;
- (2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド;
- (3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌; 及び
- (4) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-リジンを製造する方法が提供される。

【0008】以下、本発明についてさらに詳細に説明す

る。

【0009】本発明の「ジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子DNA」は、アスパルテートセミアルデヒドにビルビン酸を付加して、ジヒドロジピコリン酸を合成する酵素、すなわちジヒドロジピコリン酸シンセターゼ(E.C. 4. 2. 1. 52)をコードする遺伝子DNAを意味する。

【0010】ジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(以下、これを「A断片」と略称することがある)は、その塩基配列が決定された後は合成することも可能であるが、一般にはジヒドロジピコリン酸シンセターゼ生産性を有する微生物からクローニングすることができ、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、殊にプレビバクテリウム・フラバムM J 233(FERM BP-1497)およびその由来株が有利に使用される。

【0011】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである: A断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムM J-233(FERM BP-1497)株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0012】まず、プレビバクテリウム・フラバムM J-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0013】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399(宝酒造製)に挿入し、このベクターを用いてジヒドロジピコリン酸シンセターゼ遺伝子が欠損した大腸菌(エシェリヒア・コリ)変異株J E 7627(国立遺伝学研究所遺伝実験微生物保存研究センター 千411 三島市谷田111番地保存菌株)を形質転換し、選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得する。得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバムM J-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0014】かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により前記ジヒドロジピコリン酸シンセターゼが欠損した大腸菌変異株に導入し、選択培地に塗抹する。

【0015】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより、挿入されたプレビバクテリウム・フラバムM J-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0016】このようにして得られるA断片の一つは、

上記プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素BamHIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素SalIで切断することによって得られる大きさが約2.5kbのDNA断片を挙げることができる。

【0017】この約2.5kbのジヒドロジピコリン酸

シンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0018】

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Cla I	2	0.9, 0.8, 0.8
Hind III	1	2.2, 0.3
Pst I	3	1.2, 0.7, 0.4, 0.2

なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0019】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (ϕ x 174 phage) のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0020】一方、上記したプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素BamHI、SalIによって切断することにより得られる大きさが約2.5kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法、Sanger, F. et. al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, p 5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した上記約2.5kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したジヒドロジピコリン酸

シンセターゼをコードする遺伝子は、次に示す配列を有するものであり、301個のアミノ酸をコードする903塩基対から構成されている。

【0021】

【化3】上記の塩基配列を包含して成る本発明のジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製 System-1 Plus を用いて合成されたものであってもよい。

【0022】また、前記の如くプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、ジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0023】以上に詳述した大きさが約2.5kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図を図1に示す。

【0024】本発明のジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A断片) は、適当なプラスミドベクター、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でジヒドロジピコリン酸シンセターゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0025】また、本発明のジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターは、コリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、ジヒドロジピコリン酸シンセターゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であれば、いかなるプロモーターであってもよい。

【0026】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0027】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0028】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 (このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0029】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えば、プラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0030】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記ジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A断

片) をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。

【0031】このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約2.5 kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、L-リジンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-dapAと命名した。プラスミドpCRY30-dapAの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0032】このようにして造成されるジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-リジンを安定に効率よく生産することが可能となる。

【0033】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERM BP-1498)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0034】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である (特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である (特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である (特開昭61-177993号公報参照)。

【0035】これらの微生物の他に、プレバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746；プレバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020；プレバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869；コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0036】なお、宿主としてプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照) のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミド

pBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である[Bact. Rev., 36, p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0037】宿主プレバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ（濃度：0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）もしくはエチジウムブロミド（濃度：0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）等を含む培地に、1ml当り約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら、約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0038】このようにして得られるプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように[Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電[Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照]によりプラスミドを導入することが可能である。

【0039】上記の方法で形質転換して得られるジヒドロジビコリン酸シンセターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。

【0040】培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0041】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20~約40℃、好ましくは約25℃~約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができ

る。

【0042】培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができ、最適期間は3日間である。

【0043】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-リジン生成反応に使用することができる。

【0044】L-リジン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破砕物又はそれから分離された粗酵素もしくは精製酵素として、あるいは適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物、粗もしくは精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0045】しかして本発明に従えば、グルコースを、上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-リジンを生成せしめることからなるL-リジンの製造法が提供される。

【0046】グルコースと上記の培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性媒体中で好ましくは約20~約40℃、特に約25~約35℃の温度で行なうことができる。

【0047】生成するL-リジンはそれ自体既知の手段、例えば、高速液体クロマトグラフィー等の手段により反応液から分離回収することができる。

【0048】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

【0049】実施例1

プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のジヒドロジビコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）のクローニング

（A）プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 μg 、塩酸チアミン200 μg 、グルコース20g、蒸留水1l〕1lに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mM トリス緩衝液（pH 8.0）-1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この

溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000×g、20分間、10~12℃)し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mMEDTA・2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0050】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の90μlを制限酵素BamHI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このBamHI分解DNAにクローニングベクターpHSG399(宝酒造より市販)を制限酵素BamHIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mMATP、10mMMgCl₂及びT₄DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0051】(C) ジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜に用いた欠損大腸菌変異株は、エシェリヒア・コリJ E7627(dapA)である[()内はジヒドロジピコリン酸シンセターゼ遺伝子型(Genotype)を示す]。上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリJ E7627株を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地[K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 0.1g、グルコース20g、リジン20mg及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0052】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約8kbの挿入DNA断片が認められた。

【0053】本プラスミドをpHSG399-dapA

と命名した。

【0054】(D) ジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A)断片のサブクローニング

上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-dapAに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119(宝酒造より市販)ヘジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0055】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-dapAを制限酵素BamHI、SalIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素BamHI、SalIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mMATP、10mMMgCl₂及びT₄DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合させた。

【0056】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリJ E7627株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地[K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 0.1g、グルコース20g、リジン20mg及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0057】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約2.5kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約2.5kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0058】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0059】

【表2】

表2 プラスミドpUC119-dapA

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	5.7
Hind III	2	3.5, 2.2
Pst I	4	3.4, 1.2, 0.7, 0.4

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC119-dapAと命名した。

【0060】以上によりジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約2.5 kbのDNA断片(BamHI-SalI断片)を得ることができた。

【0061】実施例2

ジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含む長さが約2.5 kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法)(Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0062】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、ジヒドロジピコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子は、下記配列に示す塩基配列を有する301個のアミノ酸をコードする906の塩基対より構成されていることが判明した。

【0063】

【化4】

実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレビパテリウム・スタチオニスIFO12144(FERM BP-2515)から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。半合成培地A培地[尿素2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、K₂HPO₄ 0.5g、KH₂PO₄ 0.5g、MgSO₄ 0.5g、FeSO₄·7H₂O 6mg、MnSO₄·4~6H₂O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び蒸留水11]11に、プレビパテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液[25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタ

ン、10mMのEDTA、50mMグルコース]20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液[0.2N NaOH、1% (W/V) SDS]40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液[5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5mlの混合液]30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0064】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。

【0065】これに等量のフェノール-クロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0066】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液[トリス10mM、EDTA 1mM; HClにてpH8.0に調整]2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液[5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液]15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離を行った。

【0067】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見いだされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。

【0068】次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈澱させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

【0069】(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298(宝酒造製)0.5μgに制

限酵素SalI (5units) を37℃1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。

【0070】前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2μgに制限酵素XhoI (1unit) を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mM トリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl₂、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP及びT4 DNAリガーゼ1unit になるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0071】形質転換株は30μg/ml (最終濃度) のカナマイシン、100μg/ml (最終濃度) のIPTG (イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド) 100μg/ml (最終濃度) のX-gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルーβ-D-ガラクトピラノシド) を含むL培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1l、pH7.2) で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法 [T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90~91参照] により抽出した。

【0072】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。

【0073】次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0074】**実施例4**
プラスミドpCRY30-dapAの作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG399-dapA 5μgを制限酵素BamHI、SalIを各5units 用い、37℃で1時間反応させ分解し、平滑末端処理したものと、BamHIリンカー(宝酒造より市販) 1μlを混合し、50mM トリス緩衝液(pH7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4 DNAリガーゼ1unit の各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度であ

る)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0075】このDNAを制限酵素BamHI 3unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素BamHI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mM トリス緩衝液(pH7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4 DNAリガーゼ1unit の各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリJE7627株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地[K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 0.1g、グルコース20g、リジン20mg及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0076】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ2.5kbの挿入DNA断片が認められた。

【0077】上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0078】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。

【0079】プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERMBP-1497) プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlの Pulsus 用溶液 (272mM Sucrose、7mM KH₂PO₄、1mM MgCl₂; pH7.4) にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlの Pulsus 用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー(パイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml (最終濃度) を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0080】

【表3】

表3 プラスミドpCRY30-dapA

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	2	8.6, 2.5
EcoRI	1	11.1

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-dapAと命名した。

【0081】なお、プラスミドpCRY30-dapAにより形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-dapAは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成3年12月16日付で：微工研菌寄第12659号（FERM P-12659）として寄託されている。

【0082】実施例5

プラスミドpCRY30-dapAの安定性

前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株プレバクテリウム・フラバムMJ233-dapAを植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様に調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1ml当たり50cellsの割合になるように植菌し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15μg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

【0083】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

【0084】実施例6

レーリジンの生産

培地（尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH₂PO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、CaCl₂・2H₂O 2ppm、FeSO₄・7H₂O 2ppm、MnSO₄・4~6H₂O 2ppm、ZnSO₄・7H₂O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）100mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後プレバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ-233-dapA（FERM P-12659）を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0085】次に、本培養培地（グルコース5%、硫酸アンモニウム2.3%、KH₂PO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、FeSO₄・7H₂O 20ppm、MnSO₄・4~6H₂O 20ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%）の1000mlを2l容通気攪拌槽に仕込み、滅菌（120℃、20分間）後、前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間培養を行った。

【0086】培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液〔(NH₄)₂SO₄ 2g/l；KH₂PO₄ 0.5g/l；KH₂PO₄ 0.5g/l；MgSO₄・7H₂O 0.5g/l；FeSO₄・7H₂O 20ppm；MnSO₄・4~6H₂O 20ppm；チアミン塩酸塩100μg/l；pH7.6〕の1000mlに懸濁後、該懸濁液を2l容通気攪拌槽に仕込み、グルコース9gを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間反応を行った。

【0087】反応終了後、遠心分離（4000rpm、15分間、4℃）にて除菌した上清液中のレーリジンを定量した。その結果、上清液中のレーリジン生成量は1.1g/lであった。

【0088】この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂（H⁺型）のカラムに通してレーリジンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、レーリジン画分を濃縮し、冷エタノールでレーリジンの結晶を析出させた。その結果、300mgのレーリジン結晶が得られた。

【0089】また、比較例として、同様の条件にて、プレバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ-233（FERM BP-1497）を培養し、同様の条件にて反応させた後上清液中のレーリジンを定量した。その結果、上清液中のレーリジン生成量は0.6g/lであった。

【0090】

【化5】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のジヒドロジビコリン酸シンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

【図2】大きさが約2.5 kbの本発明DNA断片の塩基配列決定のための概略図。

【化2その1】

Met	Ser	Thr	Gly	Leu	Thr	Ala	Lys	Thr	Gly	Val	Glu	His	Phe	Gly	Thr
1				5					10					15	
Val	Gly	Val	Ala	Met	Val	Thr	Pro	Phe	Thr	Glu	Ser	Gly	Asp	Ile	Asp
			20					25					30		
Ile	Ala	Ala	Gly	Arg	Glu	Val	Ala	Ala	Tyr	Leu	Val	Asp	Lys	Gly	Leu
		35				40						45			
Asp	Ser	Leu	Val	Leu	Ala	Gly	Thr	Thr	Gly	Glu	Ser	Pro	Thr	Thr	Thr
	50					55						60			
Ala	Ala	Glu	Lys	Leu	Glu	Leu	Leu	Lys	Ala	Val	Arg	Glu	Glu	Val	Gly
65				70					75					80	
Asp	Arg	Ala	Lys	Leu	Ile	Ala	Gly	Val	Gly	Thr	Asn	Asn	Thr	Arg	Thr
			85					90					95		
Ser	Val	Glu	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Asp	Gly	Leu
			100					105					110		
Leu	Val	Val	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ser	Gln	Glu	Gly	Leu	Leu
		115						120					125		
Ala	His	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Thr	Glu	Val	Pro	Ile	Cys	Leu
		130				135						140			
Tyr	Asp	Ile	Pro	Gly	Arg	Ser	Gly	Ile	Pro	Ile	Glu	Ser	Asp	Thr	Met
145						150					155			160	

【化2その2】

[配列]

ATG AGC ACA GGT TTA ACA GCT AAG ACC GGA GTA GAG CAC TTC GGC ACC	48
Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His Phe Gly Thr	
1 5 10 15	
GTT GGA GTA GCA ATG GTT ACT CCA TTC ACG GAA TCC GGA GAC ATC GAT	96
Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly Asp Ile Asp	
20 25 30	
ATC GCT GCT GCG CCG GAA GTC GCG GCT TAT TTG GTT CAT AAG GGC TTG	144
Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp Lys Gly Leu	
35 40 45	
GAT TCT TTG GTT CTC GCG GGC ACC ACT GGT GAA TCC CCA ACG ACA ACC	192
Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Thr Thr	
50 55 60	
GCC GCT GAA AAA CTA GAA CTG CTC AAG GCC GTT CGT GAG GAA GTT GGG	240
Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu Glu Val Gly	
65 70 75 80	
GAT CCG GCG AAG CTC ATC GCC GGT GTC GGA ACC AAC AAC ACG CCG ACA	288
Asp Arg Ala Lys Leu Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn Thr Arg Thr	
85 90 95	
TCT GTG GAA CTT GCG GAA GCT GCT GCT TCT GCT GGC GCA GAC GGC CTT	336

【化3その2】

Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Asp Gly Leu			
100	105	110	
TTA GTT GTA ACT OCT TAT TAC TCC AAG CCG AGC CAA GAG GGA TTG CTG	384		
Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Leu			
115	120	125	
GCG CAC TTC GGT GCA ATT GCT GCA GCA ACA GAG GTT CCA ATT TGT CTC	432		
Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro Ile Cys Leu			
130	135	140	
TAT GAC ATT OCT GGT CGG TCA GGT ATT CCA ATT GAG TCT GAT ACC ATG	480		
Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser Asp Thr Met			
145	150	155	160
AGA CGC CTG AGT GAA TTA OCT ACG ATT TTG GCG GTC AAG GAC GCC AAG	528		
Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys Asp Ala Lys			
165	170	175	
GGT GAC CTC GTT GCA GCC ACG TCA TTG ATC AAA GAA ACC GGA CTT GCC	576		
Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr Gly Leu Ala			
180	185	190	
TGG TAT TCA GGC GAT GAC CCA CTA AAC CTT GTT TGG CTT GCT TTG GGC	624		
Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu Ala Leu Gly			
195	200	205	

【化3その3】

GGA TCA GGT TTC ATT TCC GTA ATT GGA CAT GCA GCC CCC ACA GCA TTA 672
 Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro Thr Ala Leu
 210 215 220
 CGT GAG TTG TAC ACA AGC TTC GAG GAA GGC GAC CTC GTC CGT GCG CGG 720
 Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val Arg Ala Arg
 225 230 235 240
 GAA ATC AAC GGC AAA CTA TCA CCG CTG GTA GCT GCC CAA GGT CGC TTG 768
 Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln Gly Arg Leu
 245 250 255
 GGT GGA GTC AGC TTG GCA AAA GCT GCT TCG CGT CTG CAG GGC ATC AAC 816
 Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Ser Arg Leu Gln Gly Ile Asn
 260 265 270
 GTA GGA GAT OCT CGA CTT CCA ATT ATG GCT CCA AAT GAG CGG GAA CTT 864
 Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu Arg Glu Leu
 275 280 285
 GAG GCT CTC CGA GAA GAC ATG AAA AAA GCT GGA GTT CTA TAA 906
 Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu ***
 290 295 300

【化4その1】

[配列]

ATG AGC ACA GGT TTA ACA GCT AAG ACC GGA GTA GAG CAC TTC GGC ACC	48
Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His Phe Gly Thr	
1 5 10 15	
GTT GGA GTA GCA ATG GTT ACT CCA TTC ACG GAA TOC GGA GAC ATC GAT	96
Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly Asp Ile Asp	
20 25 30	
ATC GCT GCT GGC CGC GAA GTC GCG GCT TAT TTG GTT GAT AAG GGC TTG	144
Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp Lys Gly Leu	
35 40 45	
GAT TCT TTG GTT CTC GCG GGC ACC ACT GGT GAA TOC CCA ACG ACA ACC	192
Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Thr Thr	
50 55 60	
GCC GCT GAA AAA CTA GAA CTG CTC AAG GCC GTT CGT GAG GAA GTT GGG	240
Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu Glu Val Gly	
65 70 75 80	
GAT CGG GCG AAG CTC ATC GCC GGT GTC GGA ACC AAC AAC ACG CGG ACA	288
Asp Arg Ala Lys Leu Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn Thr Arg Thr	
85 90 95	
TCT GTG GAA CTT GCG GAA GCT GCT GCT TCT GCT GGC GCA GAC GGC CTT	336

【化4その2】

Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Asp Gly Leu
 100 105 110
 TTA GTT GTA ACT OCT TAT TAC TCC AAG CCG AOC CAA GAG GGA TTG CTG 384
 Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Leu
 115 120 125
 GCG CAC TTC GGT GCA ATT GCT GCA GCA ACA GAG GTT CCA ATT TGT CTC 432
 Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro Ile Cys Leu
 130 135 140
 TAT GAC ATT CCT GGT CCG TCA GGT ATT CCA ATT GAG TCT GAT ACC ATG 480
 Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser Asp Thr Met
 145 150 155 160
 AGA CCG CTG AGT GAA TTA OCT ACG ATT TTG GCG GTC AAG GAC GCC AAG 528
 Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys Asp Ala Lys
 165 170 175
 GGT GAC CTC GTT GCA GCC ACG TCA TTG ATC AAA GAA ACG GGA CTT GCC 576
 Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr Gly Leu Ala
 180 185 190
 TGG TAT TCA GGC GAT GAC CCA CTA AAC CTT GTT TGG CTT GCT TTG GGC 624
 Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu Ala Leu Gly
 195 200 205

【化4その3】

GGA TCA GGT TTC ATT TCC GTA ATT GGA CAT GCA GCC OCC ACA GCA TTA 672

Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro Thr Ala Leu

210

215

220

CGT GAG TTG TAC ACA AGC TTC GAG GAA GGC GAC CTC GTC CGT GCG CGG 720

Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val Arg Ala Arg

225

230

235

240

GAA ATC AAC GCC AAA CTA TCA CCG CTG GTA GCT GCC CAA GGT GCG TTG 768

Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln Gly Arg Leu

245

250

255

GGT GGA GTC AGC TTG GCA AAA GCT GCT TCG CGT CTG CAG GGC ATC AAC 816

Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Ser Arg Leu Gln Gly Ile Asn

260

265

270

GTA GGA GAT CCT OCA CTT OCA ATT ATG GCT OCA AAT GAG CCG GAA CTT 864

Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu Arg Glu Leu

275

280

285

GAG GCT CTC CGA GAA GAC ATG AAA AAA GCT GGA GTT CTA TAA 906

Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu ***

290

295

300

【化5その1】

配列番号：1

配列の長さ：906

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-906

特徴を決定した方法：P

配列

ATG AGC ACA GGT TTA ACA GCT AAG AOC GGA GTA GAG CAC TTC GGC ACC 48

Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His Phe Gly Thr

1 5 10 15

GTT GGA GTA GCA ATG GTT ACT CCA TTC ACG GAA TCC GGA GAC ATC GAT 96

Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly Asp Ile Asp

20 25 30

【化5その2】

ATC GCT GCT GGC CGC GAA GTC CCG GCT TAT TTG GTT GAT AAG GGC TTG 144

Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp Lys Gly Leu

35

40

45

GAT TCT TTG GTT CTC GCG GGC ACC ACT GGT GAA TCC CCA ACG ACA ACC 192

Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Thr Thr

50

55

60

GCC GCT GAA AAA CTA GAA CTG CTC AAG GCC GTT CGT GAG GAA GTT GGC 240

Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu Glu Val Gly

65

70

75

80

GAT CCG GCG AAG CTC ATC GCC GGT GTC GGA ACC AAC AAC ACG CCG ACA 288

Asp Arg Ala Lys Leu Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn Thr Arg Thr

85

90

95

TCT GTG GAA CTT GCG GAA GCT GCT GCT TCT GCT GGC GCA GAC GGC CTT 336

Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Asp Gly Leu

100

105

110

TTA GTT GTA ACT CCT TAT TAC TCC AAG CCG AGC CAA GAG GGA TTG CTG 384

Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Leu

115

120

125

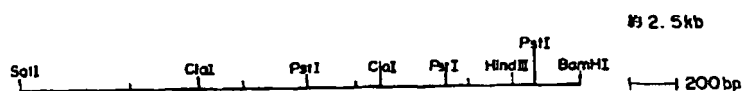
【化5その3】 GCG CAC TTC GGT GCA ATT GCT GCA GCA ACA GAG GTT CCA ATT TGT CTC 432

Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro Ile Cys Leu
 130 135 140
 TAT GAC ATT OCT GGT CGG TCA GGT ATT CCA ATT GAG TCT GAT ACC ATG 480
 Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser Asp Thr Met
 145 150 155 160
 AGA CGC CTG AGT GAA TTA CCT ACG ATT TTG GCG GTC AAG GAC GCC AAG 528
 Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys Asp Ala Lys
 165 170 175
 GGT GAC CTC GTT GCA GCC ACG TCA TTG ATC AAA GAA ACG GCA CTT GCC 576
 Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr Gly Leu Ala
 180 185 190
 TGG TAT TCA GGC GAT GAC CCA CTA AAC CTT GTT TGG CTT GCT TTG GGC 624
 Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu Ala Leu Gly
 195 200 205
 GGA TCA GGT TTC ATT TCC GTA ATT GGA CAT GCA GCC CCC ACA GCA TTA 672
 Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro Thr Ala Leu
 210 215 220
 CGT GAG TTG TAC ACA AGC TTC GAG GAA GGC GAC CTC GTC CGT GCG CGG 720
 Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val Arg Ala Arg
 225 230 235 240

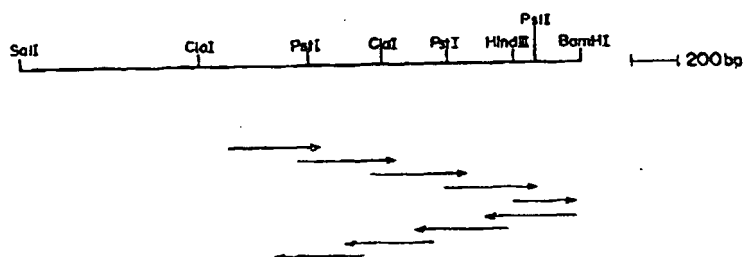
【化5その4】

GAA ATC AAC GCC AAA CTA TCA CCG CTG GTA GCT GCC CAA GGT CGC TTG 768
 Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln Gly Arg Leu
 245 250 255
 GGT GGA GTC AGC TTG GCA AAA GCT GCT TCG CGT CTG CAG GCC ATC AAC 816
 Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Ser Arg Leu Gln Gly Ile Asn
 260 265 270
 GTA GGA GAT CCT CGA CTT CCA ATT ATG GCT CCA AAT GAG CGG GAA CTT 864
 Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu Arg Glu Leu
 275 280 285
 GAG GCT CTC CGA GAA GAC ATG AAA AAA GCT GGA GTT CTA TAA 906
 Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu ***
 290 295 300

【图1】



【图2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 13/08		A 8931-4B		
//(C 1 2 N 15/60				
C 1 2 R 1:13)				
(C 1 2 N 9/88				
C 1 2 R 1:13)				
(C 1 2 P 13/08				
C 1 2 R 1:13)				

(72) 発明者 湯川 英明
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三
菱油化株式会社筑波総合研究所内

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-284970

(43)公開日 平成5年(1993)11月2日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/53	Z N A	7236-4B		
1/21				
15/77				
C 1 2 P 13/08	A	8931-4B		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求	請求項の数 8 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-85167

(22)出願日 平成4年(1992)4月7日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小浜 恵子

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 久留主 泰朗

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 山本 隆也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子DNA及びその利用

(57)【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233からジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を単離し、この遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 このジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-d a p YのL-リジン産生能は著しく増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ブレビバクテリウム属細菌由来のジアミノピメルリン酸デヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 4. 1. 16.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 ブレビバクテリウム属細菌がブレビバク

テリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ 233 である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

```

ATGACCAACA TCCGCGTAGC TATCGTGGGC TACGGAAACC TGGGACGCAG CGTCGAAAAG 60
CTTATTGCCA AGCAGCCCGA CATGGACCTT GTAGGAATCT TCTCGGCGCG GGCCACGCTC 120
GACACAAAGA CGCCAGTCTT TGATGTGCGC GAOGTGGACA AGCACGCCGA CGACGTGGAC 180
GTGCTGTTCG TGTGCATGGG CTCGCGCACG GACATCCCTG AGCAGGCACG AAAGTTGCGG 240
CAGTTCGCCT GCACGCTAGA CACCTACGAC AACACCGCG ACATCCACG CCACCGCGAG 300
GTCATGAACG AAGCCGCCAC CGCAGCCGCG AACGTTGCAC TGGTCTCTAC CGGCTGGGAT 360
CCAGGAATGT TCTCCATCAA CCGCGTCTAC GCAGCGGCAG TCTTAGCCGA GCACCGCAG 420
CACACCTTCT GGGGCCAGG TTTGTACAG GGCCACTGCG ATGCTTTGCG ACGCATCCCT 480
GGCGTTCAAA AGGCAGTCCA GTACACCTC CCATCGAAG ACGCCCTGGA AAAGCCCGC 540
CCCGCGAAG CCGCGACCT TACCGAAAG CAAACCCACA AGCCCAATG CTTCGTGCTT 600
GCGAAGCGG CCGATCAGA GCGCATCGAA AACGACATC GCACCATGCC TGATTACTTC 660
GTTGGCTACG AAGTCGAAGT CACTTCATC GACGAAGCAA CTTTCAGCG CGAGCACACC 720
GGCATGCCAC ACGGTGGCCA CGTGATTACC ACGCGGACA CCGGTGCTT CAACACACC 780
GTGGAATACA TCCTCAAGCT GGACCGAAAC CCAGATTCA CCGCTTCCG GCAGATCGCT 840
TTCGGTCGCG CAGCTCACCG CATGAAGCAG CAGGGCCAAA GCGGAGCTT CACCGTCTC 900
GAAGTTGCTC CATACTGCT CTCGCCAGAG AACTGGACC ATCTGATCG ACGCGACGTC 960
TAA 963

```

で示されるジアミノピメルリン酸デヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 4. 1. 16.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

```

Met Thr Asn Ile Arg Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Arg
1 5 10 15
Ser Val Glu Lys Leu Ile Ala Lys Gln Pro Asp Met Asp Leu Val Gly
20 25 30
Ile Phe Ser Arg Arg Ala Thr Leu Asp Thr Lys Thr Pro Val Phe Asp
35 40 45
Val Ala Asp Val Asp Lys His Ala Asp Asp Val Asp Val Leu Phe Leu
50 55 60
Cys Met Gly Ser Ala Thr Asp Ile Pro Glu Gln Ala Pro Lys Phe Ala
65 70 75 80
Gln Phe Ala Cys Thr Val Asp Thr Tyr Asp Asn His Arg Asp Ile Pro
85 90 95
Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val
100 105 110
Ala Leu Val Ser Thr Gly Trp Asp Pro Gly Met Phe Ser Ile Asn Arg
115 120 125
Val Tyr Ala Ala Ala Val Leu Ala Glu His Gln Gln His Thr Phe Trp
130 135 140
Gly Pro Gly Leu Ser Gln Gly His Ser Asp Ala Leu Arg Arg Ile Pro
145 150 155 160
Gly Val Gln Lys Ala Val Gln Tyr Thr Leu Pro Ser Glu Asp Ala Leu
165 170 175
Glu Lys Ala Arg Arg Gly Glu Ala Gly Asp Leu Thr Gly Lys Gln Thr
180 185 190
His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg
195 200 205

```

Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu
 210 215 220
 Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ala Glu His Thr
 225 230 235 240
 Gly Met Pro His Gly Gly His Val Ile Thr Thr Gly Asp Thr Gly Gly
 245 250 255
 Phe Asn His Thr Val Glu Tyr Ile Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Asp
 260 265 270
 Phe Thr Ala Ser Ala Gln Ile Ala Phe Gly Arg Ala Ala His Arg Met
 275 280 285
 Lys Gln Gln Gly Gln Ser Gly Ala Phe Thr Val Leu Glu Val Ala Pro
 290 295 300
 Tyr Leu Leu Ser Pro Glu Asn Leu Asp Asp Leu Ile Ala Arg Asp Val
 305 310 315 320

で示されるジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 4. 1. 16.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項8】 グルコースを、請求項7記載のコリネ型細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させてL-リジンを生成せしめることを特徴とするL-リジンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 4. 1. 16.) をコードする遺伝子を含むブレヴィバクテリウム属細菌由来の遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び該コリネ型細菌を用いるL-リジンの製造法に関する。

【0002】 L-リジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物として用いられている。

【0003】

【従来の技術】 従来、L-リジンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてL-リジンを製造する方法が知られている（例えば、特公昭51-21078号公報、特公昭53-1833号公報、特公昭62-8692号公報等参照）。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている（特開昭56-160997号公報、特開昭60-62994号公報、特開昭62-79788号公報等参照）。しかしながら、従来提案されている方法によるL-リジンの製造法では、対糖収率が低く及び/又はL-リジンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株

の改良等を含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】 一方、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 4. 1. 16.) をコードする遺伝子としては、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 由来のものが知られている (Nucleic Acids Research 15, p3917, 1987参照)。しかしながら、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 4. 1. 16.) をコードする遺伝子については従来の報告例は見当たらない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、ブレヴィバクテリウム属細菌由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 4. 1. 16.) をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるブレヴィバクテリウム属細菌に導入し、該ブレヴィバクテリウム属細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-リジンを製造することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ブレヴィバクテリウム属細菌染色体よりジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-リジンを製造しうることを見出し本発明を完成するに至った。

【0007】 かくして本発明によれば

- (1) ブレヴィバクテリウム属細菌由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子DNA；
- (2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド；
- (3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌；及び
- (4) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-リジンを製造する方法が提供され

る。

【0008】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子DNA」とは、ジアミノピメリン酸よりアンモニアを解離させ水を付加する酵素、すなわちジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 4. 1. 16.) をコードする遺伝子DNAを意味するものである。

【0009】ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (以下、これを「A断片」と略称することがある) は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ生産性微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、プレビバクテリウム属細菌、殊にプレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0010】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである：A断片は、上記プレビバクテリウム属細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0011】まず、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばKpnI, XhoIを用いて染色体DNAを完全に分解する。得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399 (宝酒造製) に挿入し、このベクターを用いて、サクシニルジアミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子が欠損したL-リジン要求性大腸菌 (エシェリヒア・コリ) 変異株CGSC4545 (エシェリヒア・コリ ジエネテック・ストックセンター (Escherichia coli Genetic Stock Center)、デパートメントオブバイオロジー、ユールユニバーシティ (Department of Biology, Yale University); P. O. Box 6666 New Haven, CT 06

511-744, U. S. A. 保存菌株) を形質転換し、選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得する。さらに形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、サクシニルジアミノピメリン酸アシラーゼ遺伝子が欠損したL-リジン要求性大腸菌変異株CGSC4558 (エシェリヒア・コリ ジエネテック・ストックセンター (Escherichia coli Genetic Stock Center)、デパートメントオブバイオロジー、ユールユニバーシティ (Department of Biology, Yale University); P. O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744, U. S.

A. 保存菌株) を形質転換し、選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得することができる。

【0012】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを、通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により、前記L-リジン要求性大腸菌変異株CGSC4545又はCGSC4558に導入し、選択培地に塗抹する。

【0013】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素KpnIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素XhoIで切断することによって得られる大きさが約1.6 kbのDNA断片を挙げることができる。

【0014】この約1.6 kbのジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記第1表に示す。

【0015】

【表1】

第 1 表

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	1	0.6、1.0
SphI	1	0.2、1.4
Hind III	1	0.7、0.9
NaeI	2	0.8、0.3、0.5

【0016】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体

既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0017】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (ϕ x174 phage) のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出した。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求めた。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0018】一方、上記のプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素Kpn IおよびXho Iによって切断することにより得られる大きさが約1.6 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118および/またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシスクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法、Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した上記約1.6 kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したジアミノビメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号: 1に示す配列を有するものであり、320個のアミノ酸をコードする960の塩基対から構成されている。

【0019】上記した後記配列表の配列番号: 1に示す塩基配列を包含する本発明のジアミノビメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のプレバクテリウム風細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベクマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0020】また、上記の如くプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、ジアミノビメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれも

が、本発明のジアミノビメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0021】以上に詳述した大きさが約1.6 kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図を図1に示す。本発明のジアミノビメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA (A断片) は、適当なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でジアミノビメリン酸デヒドロゲナーゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0022】また、本発明のジアミノビメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、ジアミノビメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってよい。

【0023】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30; 特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX; 特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3; 特開昭58-67679号公報に記載のpAM330; 特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519; 特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844; 特開昭57-134500号に記載のpCG1; 特開昭58-35197号公報に記載のpCG2; 特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0024】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0025】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 (このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出し、制限酵素Xho Iで大きさが約4.0 kbのプラス

ミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298(宝酒造製)のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0026】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0027】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記ジアミノピメルン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。かくして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.6kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、L-リジンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-dapYと命名した。プラスミドpCRY30-dapYの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0028】このようにして造成されるジアミノピメルン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-リジンを安定に効率よく生産することが可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41(FERM BP-1498)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11(FERM BP-1500)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21(FERM BP-1499)等が挙げられる。

【0029】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である(特公昭59-28398号公報参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性

変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0030】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス(*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746;プレビバクテリウム・デバリカタム(*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0031】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502(特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である[Bact. Rev. 36 p. 361~405(1972)参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0032】宿主プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ(濃度:0.2~50 μ g/ml)もしくはエチジウムブロミド(濃度:0.2~50 μ g/ml)等を含む培地に、1ml当り約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0033】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように[Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796(1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293(1988)参照]、DNA受容菌へのパルス波通電[Sato, Y. et al., Journal of Industria

1 Microbiology, 5, 159 (1990) 参照] によりプラスミドを導入することが可能である。

【0034】かくして得られる、本発明の、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子DNAが導入されたプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌は、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ高産能を有しており、L-リジンの製造に好適に用いることができる。これらのコリネ型細菌の好適具体例としては、例えば前記プラスミドpCRY30-dapYを保有するブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233-dapY (FERM P-12859) を挙げることができる。

【0035】上記の方法で形質転換して得られるジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ産能を有するコリネ型細菌、例えばブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0036】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20～約40℃、好ましくは約25℃～約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5～10、好ましくは7～8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1～5容量%、更に好ましくは2～3容量%である。また、培養期間は通常1～7日間とすることができ、最適期間は3日間である。

【0037】このようにして得られる培養物又は培養物から得られる菌体はL-リジンの製造に使用することができる。L-リジン生成反応においては、これらの培養物又は菌体をそのまま用いることができ、あるいは菌体に超音波処理等を加えた菌体破砕物、さらにそれから分離回収した粗酵素又は精製酵素として、あるいはそれらを適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物や粗または精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0038】しかし本発明に従えば、グルコースを、上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-リジンを生成せしめることからなるL-リジンの製造法が提供される。グルコースと上記培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性反応液中におい

て、行なうことができる。

【0039】特に、本発明のプラスミドで形質転換する宿主微生物がビオチン要求性のコリネ型細菌である場合は、上記の如く調製された培養菌体またはその固定化物と、少なくともグルコースを含有しかつビオチンを含有しない水性反応液中で、グルコースを接触させてL-リジンを生成せしめるのが好適である。この場合、ビオチン要求性のコリネ型細菌はビオチンを実質的に含有しない水性反応液中では菌体増殖せずに、該菌体の保有する代謝系においてグルコースがエネルギー共役を伴う酵素反応を介して反応せしめられ、L-リジンが製造される。

【0040】上記水性反応液中のグルコース濃度は、通常0.1～5.0重量%の範囲内とすることができる。グルコースは反応中上記範囲内の濃度に維持されるように連続的または間欠的に水性反応液に添加するのが好ましい。該水性反応液は、上記のように、グルコースを含有しかつビオチンを実質的に含有しない水あるいはリン酸またはトリス塩等の緩衝液であることもできるが、好ましくはグルコースを含有しかつビオチンを含有しない合成培地が用いられる。この合成培地には、酵母エキス、ペプトン、コーンステープリカー等の天然栄養物質を含まない化学構造が既知の無機窒素源及び/又は無機物を含有する水溶液が包含される。本発明において用いる合成培地の無機窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等を例示することができ、また、無機物としては、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸鉄等を例示することができる。これらの無機窒素源および無機塩はそれぞれ、単独でまたは2種以上混合して用いることができる。

【0041】本発明に従うL-リジン製造法において用いられる合成培地の一例を示すと次のとおりである：

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/l; KH_2PO_4 0.5g/l; K_2HPO_4 0.5g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20ppm; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim6\text{H}_2\text{O}$ 20ppm 含有するpH7.6の水溶液。

【0042】本発明のL-リジン製造法において使用される前記のようにして調製された培養菌体又は菌体処理物の使用量は、特に制限されるものではないが、培地の容量を基準にして一般に1～50% (wt/vol)、好ましくは2～20% (wt/vol) の範囲内の濃度で使用することができる。上記したとおりの組成を有する水性反応液中における培養菌体又は菌体処理物を用いる酵素反応は、一般に約20～約50℃、好ましくは約30～約40℃の温度で通常約10～約72時間行うことができる。

【0043】上記の如く酵素反応によって生成するL-

リジンの水性反応液からの分離、精製は、それ自体既知の通常用いられる方法に従って行なうことができ、例えば、イオン交換樹脂処理法、晶析法等の方法を適宜組合せて行うことができる。

【0044】また、本発明のコリネ型細菌は、通常の酵素法及び菌体増殖を伴う通常の発酵法によるL-リジンの製造法にも用いることができる。

【0045】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例1

プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA(A断片)のクローン化

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 MnSO_4 4~6 H_2O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 μg 、塩酸チアミン200 μg 、グルコース20g、蒸留水1l〕1lにプレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100mg/mlになるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000 \times g、20分間、10~12℃)し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlに加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0046】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の90 μl を制限酵素KpnI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このKpnI分解DNAにクローニングベクターpHSG399(宝酒造より市販)を制限酵素KpnIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及

びT₄ DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0047】(C) ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が導入されたプラスミドの選択は、L-リジン要求性大腸菌変異株、すなわちエシェリヒア・コリCGSC4545〔サシニルジアミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子欠損株；遺伝子型(Genotype) : dapD〕およびエシェリヒア・コリCGSC4548〔サクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ遺伝子欠損株；遺伝子型(Genotype) : dapE〕を用いて行った。

【0048】上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により上記エシェリヒア・コリCGSC4545株を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地〔 K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解〕に塗抹した。さらに形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し前記エシェリヒア・コリCGSC4558株を形質転換し、選択培地に塗抹し、両変異株を相補する形質転換株をスクリーニングした。

【0049】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ4.2kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpHSG399-dapYと命名した。

【0050】(D) ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のサブクローニング

上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-dapYに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119(宝酒造より市販)へジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0051】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-dapYを制限酵素KpnIおよびXhoIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素KpnI、SalIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及びT₄ DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結

合させた。

【0052】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリCGSC4558株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地 [K_2HPO_4 7g, KH_2PO_4 2g, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g, グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解] に塗抹した。

【0053】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を

第2表 プラスミドpUC119-dapY

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	1	4.8
SphI	2	3.4, 1.4
HindIII	2	4.1, 0.7

【0056】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC119-dapYと命名した。

【0057】以上によりジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約1.6kbのDNA断片 (KpnI-XhoI断片) を得ることができた。

【0058】実施例2

ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定実施例1の(D)項で得られたジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む長さが約1.6kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118、pUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination法) (Sahger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0059】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号: 1に示す配列を有する320個のアミノ酸をコードする960の塩基対より構成されていることが判明した。

【0060】実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。

【0061】半合成培地A培地 [尿素2g, $(NH_4)_2SO_4$ 7g, K_2HPO_4 0.5g, KH_2PO_4 0.

用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約1.6kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約1.6kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0054】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記第2表に示す。

【0055】

【表2】

5g, $MgSO_4$ 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 6mg, $MnSO_4 \cdot 4 \sim 6H_2O$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200 μ g、塩酸チアミン200 μ g、グルコース20g及び蒸留水1l) 1lに、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液 [25mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、10mMのEDTA、50mMグルコース] 20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液 [0.2N NaOH、1% (W/V) SDS] 40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5mlの混合液] 30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0062】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000 \times gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液 (フェノール:クロロホルム=1:1混和液) を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000 \times gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000 \times gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0063】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液 [トリス10mM, EDTA 1mM; HClにてpH8.0に調整] 2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液] 15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000 \times gの遠心分離を行った。

【0064】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見いだされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後TBE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

【0065】(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298 (宝酒造製) 0.5μgを制限酵素SalI (5units) を37℃1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。上記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2μgに制限酵素XhoI (1unit) を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。

【0066】両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル (宝酒造製) を形質転換した。

【0067】形質転換株は30μg/ml (最終濃度) のカナマイシン、100μg/ml (最終濃度) のIPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) 100μg/ml (最終濃度) のX-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド) を含むL培地 (トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1l、pH7.2) で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90~91参照] により抽出した。

【0068】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-ori

のKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0069】実施例4

プラスミドpCRY30-dapYの作成及びコリネ型細菌の導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG399-dapY5μgを制限酵素KpnIおよびXhoIを各5units用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、EcoRIリンカー (宝酒造より市販) 1μlを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂ およびT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0070】このDNAを制限酵素EcoRI 3unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素EcoRI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂ およびT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSC4558株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地 (K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解) に塗抹した。

【0071】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ1.6kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、電気パルス法を用いてコリネ型細菌へ次のとおり形質転換した。

【0072】プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlの Puls 用溶液 (272mM Sucrose、7mM KH₂PO₄、1mM MgCl₂; pH7.4) にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlの Puls 用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー (バイオラ社製) を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを加後水中に20

分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml（最終濃度）を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2～3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3（A）項に記載の方法を用いてプラスミドを得

第3表 プラスミドpCRY30-dapY

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
EcoRI	2	8.7、1.6
BamHI	2	7.2、3.1
KpnI	1	10.3
XhoI	1	10.3

【0074】上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-dapYと命名した。このプラスミドの制限酵素による切断点地図を図3に示す。

【0075】なお、プラスミドpCRY30-dapYにより形質転換されたブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233-dapYは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成4年3月10日付で：微工研菌寄第12859号（FERM P-12859）として寄託されている。

【0076】実施例5

プラスミドpCRY30-dapYの安定性

前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233-dapYを植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様に調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1ml当たり50cellsの割合になるように植菌し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15μg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

【0077】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

【0078】実施例6

L-リジンの生産

培地（尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH₂PO₄0.05%、K₂HPO₄0.05%、MgSO₄・7H₂O0.05%、CaCl₂・2H₂O2ppm、FeSO₄・7H₂O2ppm、MnSO₄・4~6H₂O2ppm、ZnSO₄・7H₂O2ppm、NaCl2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）100mlを500ml容三角フラスコ

た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記第3表に示す。

【0073】

【表3】

スコに分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後ブレヴィバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ233-dapY（FERM P-12859号）を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0079】次に、本培養培地（グルコース5%、硫酸アンモニウム2.3%、KH₂PO₄0.05%、K₂HPO₄0.05%、MgSO₄・7H₂O0.05%、FeSO₄・7H₂O20ppm、MnSO₄・4~6H₂O20ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl100μg/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%）の1000mlを2l容通気攪拌槽に仕込み、滅菌（120℃、20分間）後、前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間培養を行った。

【0080】培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液〔(NH₄)₂SO₄2g/l；KH₂PO₄0.5g/l；KH₂PO₄0.5g/l；MgSO₄・7H₂O0.5g/l；FeSO₄・7H₂O20ppm；MnSO₄・4~6H₂O20ppm；チアミン塩酸塩100μg/l；pH7.6〕の1000mlに懸濁後、該懸濁液を2l容通気攪拌槽に仕込み、グルコース9gを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間反応を行った。

【0081】反応終了後、遠心分離（4000rpm、15分間、4℃）にて除菌した上清液中のL-リジンを定量した。その結果、上清液中のL-リジン生成量は、1.0g/lであった。この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂（H⁺型）のカラムに通してL-リジンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、L-リジン画分を濃縮し、冷エタノールでL-リジンの結晶を析出させた。その結果、260mgのL-リジン結晶を得た。

【0082】また、比較例として、同様の条件にて、ブレヴィバクテリウム・フラバム（*Brevibacter*

ium flavum) MJ-233 (FERM BP-1497) を培養し、同様の条件にて反応させた後上清液中の L-リジン を定量した。その結果、上清液中の L-リジン 生成量は 0.6 g/l であった。

【0083】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：963

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-963

特徴を決定した方法：p

配列

ATG ACC AAC ATC CGC GTA GCT ATC GTG GGC TAC GGA AAC CTG GGA CGC	48
Met Thr Asn Ile Arg Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Arg	
1 5 10 15	
AGC GTC GAA AAG CTT ATT GCC AAG CAG CCC GAC ATG GAC CTT GTA GGA	96
Ser Val Glu Lys Leu Ile Ala Lys Gln Pro Asp Met Asp Leu Val Gly	
20 25 30	
ATC TTC TCG CGC CGG GGC ACC CTC GAC ACA AAG ACG CCA GTC TTT GAT	144
Ile Phe Ser Arg Arg Ala Thr Leu Asp Thr Lys Thr Pro Val Phe Asp	
35 40 45	
GTC GCC GAC GTG GAC AAG CAC GCC GAC GAC GTG GAC GTG CTG TTC CTG	192
Val Ala Asp Val Asp Lys His Ala Asp Asp Val Asp Val Leu Phe Leu	
50 55 60	
TGC ATG GGC TCC GCC ACC GAC ATC OCT GAG CAG GCA CCA AAG TTC GCG	240
Cys Met Gly Ser Ala Thr Asp Ile Pro Glu Gln Ala Pro Lys Phe Ala	
65 70 75 80	
CAG TTC GCC TGC ACC GTA GAC ACC TAC GAC AAC CAC CGC GAC ATC CCA	288
Gln Phe Ala Cys Thr Val Asp Thr Tyr Asp Asn His Arg Asp Ile Pro	
85 90 95	
CGC CAC CGC CAG GTC ATG AAC GAA GCC GCC ACC GCA GCC GGC AAC GTT	336
Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val	
100 105 110	
GCA CTG GTC TCT ACC GGC TGG GAT CCA GCA ATG TTC TCC ATC AAC CGC	384
Ala Leu Val Ser Thr Gly Trp Asp Pro Gly Met Phe Ser Ile Asn Arg	
115 120 125	
GTC TAC GCA GCG GCA GTC TTA GGC GAG CAC CAG CAG CAC ACC TTC TGG	432
Val Tyr Ala Ala Ala Val Leu Ala Glu His Gln Gln His Thr Phe Trp	
130 135 140	
GGC CCA GGT TTG TCA CAG GGC CAC TCC GAT GCT TTG CGA CGC ATC OCT	480
Gly Pro Gly Leu Ser Gln Gly His Ser Asp Ala Leu Arg Arg Ile Pro	
145 150 155 160	
GGC GTT CAA AAG GCA GTC CAG TAC ACC CTC CCA TCC GAA GAC GGC CTG	528
Gly Val Gln Lys Ala Val Gln Tyr Thr Leu Pro Ser Glu Asp Ala Leu	
165 170 175	
GAA AAG GCC CGC CGC GGC GAA GCC GGC GAC CTT ACC GGA AAG CAA ACC	576
Glu Lys Ala Arg Arg Gly Glu Ala Gly Asp Leu Thr Gly Lys Gln Thr	
180 185 190	
CAC AAG CGC CAA TGC TTC GTG GTT GCC GAC GCG GCC GAT CAC GAG CGC	624
His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg	
195 200 205	
ATC GAA AAC GAC ATC CGC ACC ATG OCT GAT TAC TTC GTT GGC TAC GAA	672

Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu
 210 215 220
 GTC GAA GTC AAC TTC ATC GAC GAA GCA ACC TTC GAC GCC GAG CAC ACC 720
 Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ala Glu His Thr
 225 230 235 240
 GGC ATG CCA CAC GGT GGC CAC GTG ATT ACC ACC GGC GAC ACC GGT GGC 768
 Gly Met Pro His Gly Gly His Val Ile Thr Thr Gly Asp Thr Gly Gly
 245 250 255
 TTC AAC CAC ACC GTG GAA TAC ATC CTC AAG CTG GAC CGA AAC CCA GAT 816
 Phe Asn His Thr Val Glu Tyr Ile Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Asp
 260 265 270
 TTC ACC GCT TCC GCG CAG ATC GCT TTC GGT CGC GCA GCT CAC CGC ATG 864
 Phe Thr Ala Ser Ala Gln Ile Ala Phe Gly Arg Ala Ala His Arg Met
 275 280 285
 AAG CAG CAG GGC CAA AGC GGA GCT TTC ACC GTC CTC GAA GTT GCT CCA 912
 Lys Gln Gln Gly Gln Ser Gly Ala Phe Thr Val Leu Glu Val Ala Pro
 290 295 300
 TAC CTG CTC TCC CCA GAG AAC TTG GAC GAT CTG ATC GCA CGC GAC GTC 960
 Tyr Leu Leu Ser Pro Glu Asn Leu Asp Asp Leu Ile Ala Arg Asp Val
 305 310 315 320
 TAA 963

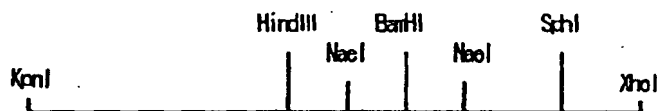
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約1.6 kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図。

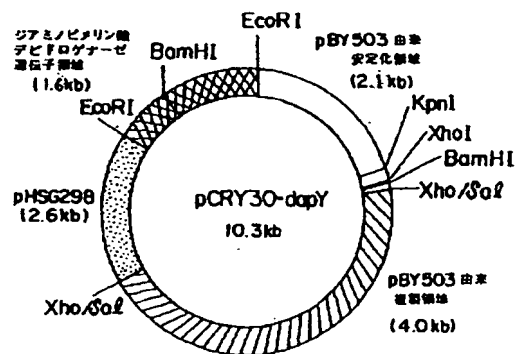
【図2】大きさが約1.6 kbの本発明DNA断片の塩基配列決定のための戦略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-dapYの制限酵素による切断点地図。

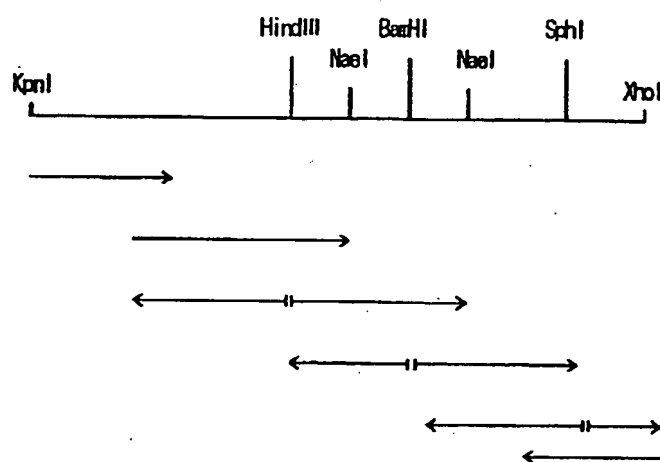
【図1】



【図3】



【図 2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

/(C 1 2 N 15/53

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 13/08

C 1 2 R 1:13)

(72) 発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央 8 丁目 3 番 1 号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内